

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/53, 15/82, 5/10, A01H 5/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 96/38567</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 5 décembre 1996 (05.12.96)									
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR96/00831 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 3 juin 1996 (03.06.96) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> <table border="0"> <tr> <td>95/06800</td> <td>2 juin 1995 (02.06.95)</td> <td>FR</td> </tr> <tr> <td>95/13570</td> <td>10 novembre 1995 (10.11.95)</td> <td>FR</td> </tr> <tr> <td>96/05944</td> <td>17 mai 1996 (17.05.96)</td> <td>FR</td> </tr> </table> <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> RHONE-POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14-20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> SAILLAND, Alain [FR/FR]; 38, rue Ernest-Fabrègue, F-69009 Lyon (FR). ROLLAND, Anne [FR/FR]; 41, rue Louis-Bouquet, F-69009 Lyon (FR). MATRINGE, Michel [FR/FR]; 5, chemin de Montpellier, F-69009 Lyon (FR). PALLETT, Ken [GB/GB]; Ongar, Essex CM5 0HW (GB). <b>(74) Mandataire:</b> CHRETIEN, François; Rhône-Poulenc Agrochimie, 14-20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).		95/06800	2 juin 1995 (02.06.95)	FR	95/13570	10 novembre 1995 (10.11.95)	FR	96/05944	17 mai 1996 (17.05.96)	FR	<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). <b>Publiée</b> <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
95/06800	2 juin 1995 (02.06.95)	FR									
95/13570	10 novembre 1995 (10.11.95)	FR									
96/05944	17 mai 1996 (17.05.96)	FR									
<b>(54) Title:</b> DNA SEQUENCE OF A GENE OF HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE AND PRODUCTION OF PLANTS CONTAINING A GENE OF HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE AND WHICH ARE TOLERANT TO CERTAIN HERBICIDES <b>(54) Titre:</b> SEQUENCE ADN D'UN GENE DE L'HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE ET OBTENTION DE PLANTES CONTENANT UN GENE DE L'HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE, TOLERANTES A CERTAINS HERBICIDES <b>(57) Abstract</b> <p>DNA sequence of a gene of hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase and production of plants containing a gene of hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase and which are resistant to herbicides. DNA sequence of a gene of hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase; isolation from a bacteria or a plant; utilization for obtaining plants tolerant to herbicides.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Séquence ADN d'un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et obtention de plantes contenant un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase, résistantes aux herbicides. Séquence ADN d'un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase; isolement à partir d'une bactérie ou d'une plante; utilisation pour l'obtention de plantes tolérantes aux herbicides.</p>											

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine			SE	Suède
CG	Congo	KR	République de Corée	SG	Singapour
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LR	Libéria	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LT	Lituanie	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	LV	Lettonie	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MC	Monaco	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MD	République de Moldova	UA	Ukraine
ES	Espagne	MG	Madagascar	UG	Ouganda
FI	Finlande	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon	MR	Mauritanie	VN	Viet Nam

Séquence ADN d'un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et obtention de plantes contenant un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase, tolérantes à certains herbicides.

5

La présente invention concerne un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD), un gène chimère contenant ce gène comme séquence codante et son utilisation pour l'obtention de plantes résistantes à certains herbicides.

On connaît certains herbicides tels que les isoxazoles décrites notamment dans les  
10 demandes de brevets français 95 06800 and 95 13570 et notamment l'isoxaflutole, herbicide sélectif du maïs, les dicétonitriles tels que ceux décrits dans les demandes européennes 0 496 630, 0 496 631, en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>-4-CF<sub>3</sub> phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO CH<sub>3</sub>-2,3 Cl<sub>2</sub> phényl) propane-1, 3-dione, les tricétones décrites dans les demandes européennes 0 625  
15 505 et 0 625 508, en particulier la sulcotrione. Cependant aucun gène de tolérance à de tels herbicides n'a été décrit.

L'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase est une enzyme qui catalyse la réaction de transformation du para-hydroxy-phényl-pyruvate en homogentisate.

Par ailleurs, la séquence en acides aminés de l'hydroxy-phényl pyruvate  
20 dioxygénase issue de *Pseudomonas sp.* P.J. 874 a été décrite, sans qu'il y ait une description de son rôle dans la tolérance des plantes aux herbicides (Rüetschi et col: Eur. J. Biochem. 205, 459-466, 1992). Ce document ne donne pas de description du gène codant pour cette protéine.

Il a maintenant été découvert la séquence d'un gène de ce type et qu'une telle  
25 séquence pouvait, une fois incorporée dans des cellules végétales, fournir une surexpression ou une activation de l'HPPD dans les plantes conférant à ces dernières une tolérance intéressante à certains herbicides récents, tels que ceux de la famille des isoxazoles ou de celle des tricétones.

La présente invention a pour objet une séquence d'ADN d'un gène d'origine non  
30 humaine et d'une origine bactérienne non marine, ou encore d'un gène de plante, isolée ou une séquence pouvant s'hybrider avec cette séquence isolée, caractérisé en ce qu'elle exprime une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD).

Plus particulièrement cette séquence peut être d'origine bactérienne, telle que  
notamment le genre *Pseudomonas* ou encore d'origine végétale, telle que notamment de  
35 plante monocotylédone ou dicotylédone, notamment d'*Arabidopsis* ou d'ombellifères comme par exemple la carotte (*Daucus carotta*). Elle peut être native ou sauvage ou éventuellement mutée tout en gardant fondamentalement une propriété de tolérance

herbicide contre les inhibiteurs de l'HPPD, tels que les herbicides de la famille des isoxazoles ou de celle des tricétones.

L'invention comprend également un procédé d'isolement du gène ci-dessus, caractérisé en ce que:

- on choisit, comme amorces, quelques oligonucléotides issus de la séquence en acides aminés d'une HPPD,

- à partir de ces amorces, on synthétise des fragments d'amplification par PCR

- on isole le gène par création et criblage d'une banque génomique et

- on clone le gène.

De préférence on utilise des amorces issues de la séquence de l'HPPD d'une bactérie du genre *Pseudomonas*. De manière particulièrement préférée, elles sont issues de *Pseudomonas fluorescens*.

L'invention a encore pour objet l'utilisation d'un gène codant pour l'HPPD dans un procédé pour la transformation des plantes, comme gène marqueur ou comme séquence codante permettant de conférer à la plante une tolérance à certains herbicides. Il peut également être utilisé en association avec d'autres gènes marqueurs et/ou séquence codante pour une propriété agronomique.

Le gène codant peut être de toute origine, natif ou sauvage ou éventuellement muté tout en gardant fondamentalement une propriété de tolérance herbicide contre les inhibiteurs de l'HPPD, tels que les herbicides de la famille des isoxazoles ou de celle des tricétones. Comme séquence codante on peut notamment utiliser celle selon l'invention telle que décrite ci-dessus.

La transformation des cellules végétales peut être obtenue par tout moyen connu approprié. Une série de méthodes consiste à bombarder des cellules ou des protoplastes avec des particules auxquelles sont accrochées les séquences d'ADN.

Une autre série de méthodes consiste à utiliser comme moyen de transfert dans la plante d'un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*.

La présente invention a encore pour objet un gène chimère comprenant, dans le sens de la transcription, au moins une séquence de régulation promotrice, une séquence codante hétérologue qui exprime l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et au moins une séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation.

Comme séquence de régulation promotrice on peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine bactérienne, virale ou végétale tel que, par exemple, celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase (RuBisCO) ou de celui d'un gène de l' $\alpha$  tubuline ( Demande européenne EP n° 0 652 286), ou encore d'un gène de virus de plante tel que, par

exemple, celui de la mosaïque du chou fleur (CAMV 19S ou 35S), mais tout promoteur convenable connu peut être utilisé. De préférence on a recours à une séquence de régulation promotrice qui favorise la surexpression de la séquence codante, tel que par exemple, celle comprenant au moins un promoteur d'histone tel que décrit dans la

5 demande européenne EP 0507698.

Selon l'invention, on peut également utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription "enhancer", comme par exemple l'activateur de translation du virus etch du tabac (TEV) décrit dans la demande

10 WO87/07644, ou des peptides de transit, soit simples, soit doubles, et dans ce cas éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie

15 mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale. constituée d'une partie de séquence de la partie

mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, tels que décrit dans la demande européenne n° 0 508 909.

Comme séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation, on peut utiliser

20 toute séquence correspondante d'origine bactérienne, comme par exemple le terminateur nos d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore d'origine végétale, comme par exemple un terminateur d'histone tel que décrit dans la demande européenne EP n° 0 633 317.

La présente invention a encore pour objet les cellules végétales, de plantes monocotylédones ou dicotylédones, notamment des cultures, transformées selon l'un des

25 procédés décrits ci-dessus et contenant dans leur génome une quantité efficace d'un gène exprimant l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD). On a observé que des plantes transformées de cette façon présentent une tolérance importante à certains herbicides récents tels que les isoxazoles décrites notamment dans les demandes de brevets français 9506800 and 95 13570 et notamment du 4-[4-CF<sub>3</sub>-2-(méthylsulfoyl) benzoyl]-5-

30 cyclopropyl isoxazole, et notamment l'isoxaflutole, herbicide sélectif du maïs, , les dicétonitriles tels que ceux décrits dans les demandes européennes 0 496 630, 0 496 631, en particulier la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>-4-CF<sub>3</sub> phényl) propane-1,3-dione et la 2-cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>-4-2,3 Cl<sub>2</sub> phényl) propane-1, 3-dione, les

35 tricétones décrites dans les demandes européennes 0 625 505 et 0 625 508, en particulier la sulcotrione.

L'invention a enfin pour objet un procédé de désherbage de plantes, notamment de cultures, à l'aide d'un herbicide de ce type, caractérisé en ce qu'on applique cet herbicide

sur des plantes transformées selon l'invention, tant en présemis, en prélevée qu'en postlevée de la culture.

L'invention a encore pour objet l'utilisation du gène HPPD comme gène marqueur au cours du cycle "transformation-régénération" d'une espèce végétale et sélection sur

5 l'herbicide ci-dessus

Les différents aspects de l'invention seront mieux compris à l'aide des exemples expérimentaux ci-dessous.

Exemple 1: Isolement du gène de l'HPPD de *P. fluorescens* A32.

10 A partir de la séquence en acides aminés de l'HPPD de *Pseudomonas* sp. P.J. 874 (publié par Rüetschi U. et al. 1992. Eur. J. Biochem. 205: 459-466), on déduit la séquence de différents oligonucléotides pour amplifier par PCR une partie de la séquence codante de l'HPPD de *P. fluorescens* A32 (isolée par McKellar, R.C. 1982. J. Appl Bacteriol. 53:305-316). Un fragment d'amplification du gène de cette HPPD a été utilisé pour cribler une

15 banque génomique partielle de *P. fluorescens* A32 et ainsi isoler le gène codant pour cette enzyme.

A) Préparation de l'ADN génomique de *P. fluorescens* A32.

La bactérie a été cultivée dans 40 ml de milieu minnimum M63 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,6g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2g/l, MgSO<sub>4</sub> 0,2g/l, FeSO<sub>4</sub> 0,005 g/l pH7 plus L-tyrosine 10mM comme

20 seule source de carbone) à 28°C pendant 48 heures.

Après lavage, les cellules sont reprises dans 1 ml de tampon de lyse (tris HCl 100 mM pH 8,3, NaCl 1,4 M et EDTA 10 mM) et incubées 10 minutes à 65°C. Après un traitement au phénol/chloroforme (24/1) et un traitement au chloroforme, les acides nucléiques sont précipités par addition d'un volume d'isopropanol puis repris dans 300 µl d'eau stérile et

25 traités à la RNase 10 µg/ml final. L'ADN est de nouveau traité au phénol/chloroforme, chloroforme et reprécipité par addition de 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M pH5 et 2 volumes d'éthanol. L'ADN est ensuite repris dans de l'eau stérile et dosé.

B) Choix des oligonucléotides et synthèses.

A partir de la séquence en acides aminés de l'HPPD de *Pseudomonas* sp. P.J. 874 on choisit cinq oligonucléotides, deux dirigés dans le sens NH<sub>2</sub> terminal de la protéine vers le COOH terminal de la protéine et trois dirigés dans le sens inverse (voir figure 1). Le choix a été dicté par les deux règles suivantes:

30

-une extrémité 3' de l'oligonucléotide stable, c'est à dire au moins deux bases sans ambiguïté.

35 -une dégénérescence la plus faible possible.

Les oligonucléotides choisis ont les séquences suivantes:

P1: 5'TA(C/T)GA(G/A)AA(C/T)CCATGGG3'

P2: 5'GA(G/A)ACIGGICCIATGGA3'

P3: 5'AA(C/T)TGCATIA(G/A)(G/A)AA(C/T)TC(C/T)TC3'

P4: 5'AAIGCIAC(G/A)TG(C/T)TG(T/G/A)ATICC3'

P5: 5'GC(C/T)TT(A/G)AA(A/G)TTICC(C/T)TCICC3'

Ils ont été synthétisés sur le synthétiseur "Cyclone plus DNA Synthesizer" de marque

5 MILLPORE.

Avec ces cinq oligonucléotides par PCR les fragments d'amplification que l'on doit obtenir théoriquement d'après la séquence SEQ ID N°1 ont les tailles suivantes:

avec les amorces P1 et P3 -----> environ 690 bp

avec les amorces P1 et P4 -----> environ 720 bp

10 avec les amorces P1 et P5 -----> environ 1000 bp

avec les amorces P2 et P3 -----> environ 390 bp

avec les amorces P2 et P4 -----> environ 420 bp

avec les amorces P2 et P5 -----> environ 700 bp

C) Amplification d'une partie codante de l'HPPD de *P. fluorescens* A32.

15 Les amplifications ont été faites sur un appareil PCR PERKIN ELMER 9600 et avec la Taq polymérase PERKIN ELMER avec son tampon dans les conditions standards, c'est à dire pour 50µl de réaction il y a les dNTP à 200µM, les primers à 20µM, la Taq polymérase 2,5 unités et l'ADN de *P. fluorescens* A32 2,5 µg.

20 Le programme d'amplification utilisé est, 5 min à 95°C puis 35 cycles <45 sec 95°C, 45 sec 49°C, 1 min 72°C> suivis de 5 min à 72°C.

Dans ces conditions, tous les fragments d'amplification obtenus ont une taille compatible avec les tailles théoriques données au-dessus, ce qui est une bonne indication de la spécificité des amplifications.

25 Les fragments d'amplifications obtenus avec les jeux d'amorces P1/P4, P1/P5 et P2/P4 sont ligués dans pBSII SK(-) après digestion de ce plasmide par Eco RV et traitement à la terminal transférase en présence de ddTTP comme décrit dans HOLTON T.A. and GRAHAM M.W. 1991. N.A.R. vol 19, n°5 p1156.

30 Un clone de chacun des trois types est séquencé partiellement; ceci permet de confirmer qu'on a bien amplifié dans les trois cas une partie de la région codante de l'HPPD de *P. fluorescens* A32. Le fragment P1/P4 est retenu comme sonde pour cribler une banque génomique partielle de *P. fluorescens* A32 et isoler le gène complet de l'HPPD.

D) Isolement du gène.

35 Par Southern on montre qu'un fragment de 7 Kbp après digestion de l'ADN de *P. fluorescens* A32 par l'enzyme de restriction BamHI s'hybride avec la sonde HPPD P1/P4. On a donc fait digérer 400µg d'ADN de *P. fluorescens* A32 par l'enzyme de restriction BamHI et purifier sur gel d'agarose les fragments d'ADN faisant environ 7Kbp.

Ces fragments sont ligués dans pBSII SK(-), lui-même digéré par Bam HI et déphosphorylé par traitement à la phosphatase alcaline. Après transformation dans *E. coli* DH10b, la banque génomique partielle est criblée avec la sonde HPPD P1/P4.

- Un clone positif a été isolé et appelé pRP A. Sa carte simplifiée est donnée figure 2.
- 5 Sur cette carte est indiqué la position de la partie codante du gène HPPD. Elle est composée de 1077 nucléotides qui codent pour 358 acides aminés (voir SEQ ID N° 1 ). L'HPPD de *P. fluorescens* A32 présente une bonne homologie en acides aminés avec celle de *Pseudomonas* sp. strain P.J. 874, il y a en effet 92% d'identité entre ces deux protéines ( voir figure 3 ).

10

Exemple 2: Construction de deux gènes chimères.

Pour conférer la tolérance de plantes aux herbicides inhibant l'HPPD, on construit deux gènes chimères:

- Le premier consiste à mettre la partie codante du gène de l'HPPD de *P. fluorescens*
- 15 A32 sous le contrôle du promoteur double histone (Demande de Brevet européen N° 0 507 698) suivi du Tobacco etch virus translational enhancer (TEV) (pRTL-GUS (Carrington and Freed, 1990; J. Virol. 64: 1590-1597)) avec le terminateur du gène de la nopaline synthase. L'HPPD sera alors localisée dans le cytoplasme.

- Le deuxième sera identique au premier, à ceci près qu'entre l'activateur de translation
- 20 TEV et la partie codante de l'HPPD, on intercale le peptide de transit optimisé (OTP) (Demande européenne EP n° 0 508 909). L'HPPD sera alors localisée dans le chloroplaste.

A) Construction du vecteur pRPA-RD-153:

- pRPA-RD-11 Un dérivé de pBS-II SK(-) (Stratagene catalog #212206) contenant
- 25 le site de polyadénylation de la nopaline synthase (NOS polyA) ( Demande européenne EP n° 0 652 286) est cloné entre les sites *KpnI* et *Sall*. Le site *KpnI* est transformé en un site *NotI* par traitement avec la T4 ADN polymérase I en présence de 150 µM de deoxynucleotide triphosphates puis ligation avec un linker *NotI* (Stratagene catalog #1029). Ainsi on obtient une cassette de clonage NOS polyA .

- 30 - pRPA-RD-127: Un dérivé de pRPA-BL-466 (Demande européenne EP n° 0 337 899) cloné dans pRPA-RD-11 créant une cassette d'expression du gène *oxy* et contenant le promoteur de la petite sous unité de la ribulose-biscarboxylase:

" promoter (SSU) - *oxy* gene - NOS polyA"

- Pour créer ce plasmide, pRPA-BL-488 a été digéré avec *XbaI* et *HindIII* pour isoler un
- 35 fragment de 1.9 kbp contenant le promoteur SSU et le gène *oxy* qui a été ligué dans le plasmide pRPA-RD-11 digéré avec des enzymes compatibles.



- pRPA-RD-132: C'est un dérivé de pRPA-BL-488 (Demande européenne EP n° 0 507 698) cloné dans pRPA-RD-127 avec création d'une cassette d'expression du gène *oxy* avec le promoteur double histone:

" promoteur double histone - *oxy* gene - NOS polyA "

5 Pour fabriquer ce plasmide, pRPA-BL-466 est digéré par HindIII, traité par la Klenow puis redigéré avec NcoI. Le fragment de 1.35 kbp purifié contenant le promoteur double histone H3A748 est ligué avec le plasmide pRPA-RD-127 qui avait été digéré par XbaI, traité Klenow et redigéré par NcoI.

10 - pRPA-RD-153: C'est un dérivé de pRPA-RD-132 contenant l'activateur de translation du virus etch du tabac (TEV). pRTL-GUS (Carrington and Freed, 1990; J. Virol. 64: 1590-1597) est digéré avec *NcoI* et *EcoRI* et le fragment de 150 bp est ligué dans pRPA-RD-132 digéré avec les mêmes enzymes. Donc on a créé une cassette d'expression contenant le promoteur:

"double histone promoter - TEV -*oxy* gene - NOS polyA"

15 B) Construction du vecteur pRPA-RD-185:

pUC19/GECA: Un dérivé de pUC-19 (Gibco catalog #15364-011) contenant de nombreux sites de clonage. pUC-19 est digéré avec *EcoRI* et ligué avec l'oligonucléotide linker 1:

20 Linker 1: AATTGGGCCA GTCAGGCCGT TTAAACCCTA GGGGGCCCG  
CCCGGT CAGTCCGGCA AATTTGGGAT CCCC GGGC TTAA

Le clone sélectionné contient un site *EcoRI* suivi du polylinker qui contient les sites suivants: *EcoRI*, *Apal*, *AvrII*, *PmeI*, *SfiI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *PstI*, *SphI* et *HindIII*.

25 pRPA-RD-185: c'est un dérivé de pUC19/GECA contenant un polylinker modifié. pUC19/GECA est digéré par HindIII et ligué avec l'oligonucléotide linker 2:

Linker 2: AGCTTTTAAT TAAGGCGCGC CCTCGAGCCT GGTTCAGGG  
AAATTA ATTCCGCGCG GGAGCTCGGA CCAAGTCCC TCGA

30 Le clone sélectionné contient un site *HindIII* site au milieu du polylinker qui contient maintenant les sites suivants: *EcoRI*, *Apal*, *AvrII*, *PmeI*, *SfiI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*, *PacI*, *AscI* *XhoI* et *EcoNI*.

C) Construction du vecteur pRP T:

- pRP O: un dérivé de pRPA-RD-153 contenant une cassette d'expression de l'HPPD, promoteur double histone - TEV - gène HPPD - terminateur Nos. Pour fabriquer pRP O,

pRPA-RD153 est digéré par Hind III, traité par la Klenow puis redigéré par NcoI pour enlever le gène *oxy* et le remplacer par le gène HPPD sorti du plasmide pRP A par digestion BstEII, traitement par la Klenow et redigestion par NcoI.

- 5 - pRP R: pour l'obtenir le plasmide pRP O a été digéré par PvuII et SacI, le gène chimère a été purifié puis ligué dans pRPA-RD-185 lui-même digéré par PvuII et SacI.

- pRP T: il a été obtenu par ligation du gène chimère sorti de pRP R après digestion par SacI et HindIII dans le plasmide pRPA-BL 150 alpha2 digéré par les mêmes enzymes (Demande européenne EP n° 0 508 909).

Le gène chimère du vecteur pRP T a donc la structure suivante:

10

Promoteur double histone	TEV	Région codante de l'HPPD	Terminateur nos
-----------------------------	-----	-----------------------------	--------------------

#### D) Construction du vecteur pRP V

- 15 - pRP P: c'est un dérivé de pRPA-RD-7 (Demande européenne EP n° 0 652 286) contenant le peptide de transit optimisé suivi du gène de l'HPPD. Il a été obtenu par ligation de la partie codante de l'HPPD sorti de pRP A par digestion BstEII et NcoI, traitement à la Klenow et du plasmide pRPA-RD-7 lui-même digéré SphI et AccI et traité à la DNase polymérase T4.

- 20 - pRP Q: un dérivé de pRPA-RD-153 contenant une cassette d'expression de l'HPPD, promoteur double histone - TEV - OTP - gène HPPD - terminateur Nos. Pour le construire le plasmide pRPA-RD-153 est digéré par Sal I, traité par la Klenow puis redigéré par NcoI pour enlever le gène *oxy* et le remplacer par le gène HPPD sorti du plasmide pRP P par digestion BstEII, traitement par la Klenow et redigestion par NcoI.

- pRP S: pour l'obtenir, le plasmide pRP Q a été digéré par PvuII et SacI pour sortir le gène chimère qui a été ligué dans pRPA-RD-185 lui-même digéré par PvuII et SacI.

- 25 - pRP V: il a été obtenu par ligation du gène chimère sorti de pRP S après digestion par SacI et HindIII dans le plasmide pRPA-BL 150 alpha2 (Demande européenne EP n° 0 508 909).

Le gène chimère du vecteur pRP Q a donc la structure suivante:

Promoteur double histone	TEV	OTP	Région codante de l'HPPD	Terminateur nos
-----------------------------	-----	-----	--------------------------	-----------------

### Exemple 3: Transformation du tabac industriel PBD6.

Afin de déterminer l'efficacité de ces deux gènes chimériques, ceux-ci ont été transférés dans du tabac industriel PBD6 selon les procédures de transformation et de régénération déjà décrites dans la demande européenne EP n° 0 508 909.

#### 1) Transformation:

Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium* EHA 101 (Hood et al, 1987) porteuse du cosmide pTVK 291 (Komari et al, 1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh R. et al. (1985) Science, 227, 1229-1231.

#### 2) Régénération:

La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que 200ug/ml de kanamycine. Les explants foliaires sont prélevés sur des plants en serre ou in vitro et transformés selon la technique des disques foliaires (Science 1985, Vol 227, p. 1229-1231) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu MS additionné de 30g/l de saccharose contenant 0.05mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours. Les pousses formées au cours de cette étape sont ensuite développées par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose mais ne contenant pas d'hormone, pendant 10 jours. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucres et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

### Exemple 4: Mesure de la tolérance du tabac au 4-[4-CF3-2-(méthylsulfonyl) benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole: traitement de postlevée.

Au sortir de l'in-vitro, les plantules de tabac transformées ont été acclimatées à la serre (60% d'humidité relative; température: 20°C la nuit et 23°C la jour) pendant cinq semaines puis traitées au 4-[4-CF3-2-(méthylsulfonyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole.

Le tabac témoin, non transformé et traité au 4-[4-CF3-2-(méthylsulfonyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole à des doses allant de 50 à 400 g/ha, développe en environ 72 heures des chloroses, qui s'intensifient pour évoluer vers des nécroses très prononcées en une semaine (couvrant environ 80% des feuilles terminales).

Après transformation ce même tabac, qui surexprime l'HPPD de *P. fluorescens*, est très bien protégé contre un traitement au 4-[4-CF3-2-(méthylsulfonyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole à la dose de 400 g/ha.

Si l'enzyme surexprimée est dans le cytoplasme, c'est à dire si la transformation a été faite avec le gène porté par le vecteur pRP T, alors la plante présente de très légères chloroses toutes localisées sur les feuilles intermédiaires.

Si l'enzyme surexprimée est dans le chloroplaste, c'est à dire si la transformation a été faite avec le gène porté par le vecteur pRP V, alors la plante est parfaitement protégée, ne présente aucun symptôme.

Exemple 5: Mesure de la tolérance du tabac au 4-[4-CF<sub>3</sub>-2-(méthylsulfoyl) benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole: traitement de prélevée

a) test in vitro:

On utilise des graines de tabac récoltées à partir des plantes issues du cycle "transformation - régénération" résistantes à un traitement foliaire d'isoxaflutole à la dose de 400g/h décrites aux exemples 1 à 3.

Ces graines ont été semées sur des boîtes contenant du phytagar à 10 g/l et de l'isoxaflutole à différentes concentrations allant de 0 à 1 mg/l. La germination a été faite ensuite à 25°C avec une photopériode de 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité.

Selon ce protocole des graines de tabacs sauvages ont été mises à germer ainsi que des graines des deux types de tabacs transgéniques c'est à dire tabacs CY, avec localisation de l'HPPD dans le cytoplasme, et les tabacs CO avec localisation de l'HPPD dans le chloroplaste.

Les mesures de résistances sont faites visuellement entre 2 et 3 semaines après le semis.

Les résultats sont consignés dans le tableau ci-dessous.

concentration en isoxaflutole	Tabac sauvage	Tabac CY	Tabac CO
0 mg/l	100% des graines germent sans symptômes°	100% des graines germent sans symptômes°	100% des graines germent sans symptômes
0,05 mg/l	20% des graines germent et présentent des symptômes°	75% des graines germent* sans symptômes°	75% des graines germent* sans symptômes°
0,1 mg/l	pas de germination	75% des graines germent* sans symptômes°	75% des graines germent* sans symptômes°

0,5 mg/l	pas de germination	75% des graines germent* sans symptômes°	75% des graines germent* sans symptômes°
1 mg/l	pas de germination	75% des graines germent* avec légers symptômes°	75% des graines germent* sans symptômes°

° les symptômes que présentent les plantules en cours de germination sont des déformations des cotylédons plus ou moins importantes et surtout un blanchiment des tissus normalement photosynthétiques et donc verts.

5

\* 75% des graines germent car ont été semées des graines issues de l'autofécondation de plantes mono-locus sortant du cycle "transformation - régénération" ne portant donc le gène de tolérance sur un chromosome.

En opérant de la même manière avec les produits suivants produit n° 51 du brevet américain 4 780 127, on obtient les mêmes résultats à une concentration de 0 mg/l et 0,1 mg/l sur tabac sauvage et tabac CO.

10

b) test en serre:

20

On opère comme à l'exemple 4, si ce n'est que le traitement est effectué en prélevée, 24 heures avant le semis. Le semis sauvage s'effectue normalement. Dans ces conditions on observe que pour les semis témoins non traités, il n'y pas de germination pour toute dose d'herbicide au moins égale à 10 g/ha. Au contraire les tabacs CY ne présentent aucun symptôme, tel que défini au paragraphe a), jusqu'à 100 g/ha compris. De même les tabacs CO ne présentent aucun symptôme, tel que défini au paragraphe a) jusqu'à 200 g/ha compris.

15

Ces résultats montrent clairement que le gène de l'HPPD de *P. fluorescens* confère une tolérance au tabac contre les traitements en prélevée à l'isoxaflutole. Cette tolérance est meilleure si la protéine est localisée dans le chloroplaste au lieu du cytoplasme.

25

#### Exemple 6:

30

Dans le but d'étudier si le gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* peut être utilisé comme gène marqueur au cours du cycle "transformation - régénération" d'une espèce végétale, le tabac a été transformé avec le gène de l'HPPD et des plantes transformées ont été obtenues après sélection sur isoxaflutole.

Matériel et méthodes et résultats

Le gène chimérique pRP V décrit ci-dessous est transféré dans du tabac industriel PBD6 selon les procédures de transformation et de régénération déjà décrites dans la demande européenne EP n° 0 508 909.

- 5 Le gène chimère du vecteur pRP V a la structure suivante:

Promoteur double histone	TEV	OTP	Région codante de l'HPPD	Terminateur nos
-----------------------------	-----	-----	--------------------------	-----------------

## 1) Transformation:

- 10 Le vecteur est introduit dans la souche non oncogène d'*Agrobacterium* EHA 101(Hood et al,1987) porteuse du cosmide pTVK 291(Komari et al,1986). La technique de transformation est basée sur la procédure de Horsh et al(1985).

## 2) Régénération:

- 15 La régénération du tabac PBD6 (provenance SEITA France) à partir d'explants foliaires est réalisée sur un milieu de base Murashige et Skoog (MS) comprenant 30g/l de saccharose ainsi que 350 mg/l de cefotaxime et 1 mg/l d'isoxaflutole. Les explants foliaires sont prélevés sur des plants en serre ou in vitro et transformés selon la technique des disques foliaires(Science 1985, Vol 227, p.1229-1231) en trois étapes successives: la première comprend l'induction des pousses sur un milieu MS additionné de 30g/l de  
20 saccharose contenant 0.05mg/l d'acide naphtylacétique (ANA) et 2 mg/l de benzylaminopurine (BAP) pendant 15 jours et 1 mg/l d'isoxaflutole. Les pousses vertes formées au cours de cette étape sont ensuite développées par culture sur un milieu MS additionné de 30 g/l de saccharose et 1 mg/l d'isoxaflutole mais ne contenant pas d'hormone, pendant 10 jours. Puis on prélève des pousses développées et on les cultive sur  
25 un milieu d'enracinement MS à teneur moitié en sels, vitamines et sucres et 1 mg/l d'isoxaflutole et ne contenant pas d'hormone. Au bout d'environ 15 jours, les pousses enracinées sont passées en terre.

- 30 Toutes les plantules obtenues selon ce protocole sont analysées par PCR avec des amorces spécifiques de l'HPPD de *P.fluorescens*. Cette analyse PCR a permis de confirmer que toutes les plantules ainsi obtenues ont bien intégré le gène de l'HPPD.

En conclusion, cet essai confirme que le gène de l'HPPD peut être utilisé comme gène marqueur et que, associé à ce gène, l'isoxaflutole peut être un bon agent de sélection.

Exemples 7 et 8 : Isolement du gène de l'HPPD d'*Arabidopsis thaliana* et du gène de l'HPPD de carotte (*Daucus carotta*)

- a) Construction des banques d'ADNc.
- 5 Des mRNAs extraits de jeunes plantules d'*Arabidopsis thaliana*, et des mRNAs extraits de cellules de carotte en culture, ont servi à construire deux banques d'ADNc dans le vecteur Uni Zap™ XR commercialisé par la société Stratagen, suivant le protocole préconisé par cette société.
- 10 b) Criblage des banques d'ADNc
- Ces deux banques ont été criblées à l'aide d'une sonde correspondant à un ADNc d'*Arabidopsis thaliana* de longueur partielle, obtenu via l'Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio, USA) et répertorié : EST clone N° 91B13T7. Ce clone est constitué d'environ 500 paires de bases dont seulement 228 avaient été séquencées par le MSU-DOE
- 15 Plant Research Laboratory dans le cadre du séquençage au hasard des ADNc d'*Arabidopsis thaliana*. Nous avons séquencé complètement les 500 paires de bases avant d'utiliser ce clone pour cribler nos banques d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* et de carotte à l'aide de la technique classique d'hybridation des plages de lyse (référence ?).
- 20 c) Un ADNc d'*Arabidopsis thaliana* (SEQ ID N° 2) correspondant à 1338 paires de bases a été obtenu. Cet ADNc possède un codon de début d'initiation de la traduction à la position 25 et un codon de fin de traduction à la position 1336. Cet ADNc est donc complet et code pour une protéine de 445 acides aminés.
- 25 d) Un ADNc de carotte (*Daucus carotta*) (SEQ ID N° 3) correspondant à 1329 paires de bases a été obtenu. Cet ADNc possède un codon de début d'initiation de la traduction à la position 1 et un codon de fin de traduction à la position 1329. Cet ADNc est donc complet et code pour une protéine de 442 acides aminés.

30 Les séquences illustrées sont les suivantes:

SEQ ID N° 1 Séquence du gène de l'HPPD de *Pseudomonas fluorescens* A32.

SEQ ID N° 2

Séquence d'ADNc d'HPPD d'*Arabidopsis thaliana*

35

SEQ ID N° 3

séquence d'ADNc d'HPPD de *Daucus carotta*

Les figures ci-après sont données à titre indicatif pour illustrer l'invention.

La Figure 1 représente la séquence protéique de l'HPPD de *Pseudomonas sp.* strain P.J. 874 et la séquence nucléotidique théorique de la partie codante correspondante; les cinq oligonucléotides choisis pour faire l'amplification d'une partie de cette région codante sont symbolisés par les cinq flèches.

- 5 La Figure 2 représente la cartographie du plasmide avec le fragment d'ADN génomique de 7 kb contenant le gène de l'HPPD de *P. fluorescens* A32.

- La Figure 3 donne la comparaison des séquences en acides aminés de l' HPPD de *P. fluorescens* A32 et de l'HPPD de *Pseudomonas sp* strain P.J. 874 (seuls les acides aminés  
10 divergents entre les deux séquences sont indiqués) ainsi que la séquence consensus.



## Liste de séquences

### (1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Sailland, Alain  
Rolland, Anne  
Matringe, Michel  
Pallett, Kenneth E

(ii) TITLE OF INVENTION: SEQUENCE ADN D'UN GENE DE  
L'HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE ET OBTENTION DE  
PLANTES CONTENANT CE GENE DE L'HYDROXY-PHENYL PYRUVATE  
DIOXYGENASE, RESISTANTES A CERTAINS HERBICIDES

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 3

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:

(A) ADDRESSEE: Francois Chretien  
(B) STREET: 14-20 rue Pierre BAIZET  
(C) CITY: Lyon Cedex 09  
(E) COUNTRY: France  
(F) ZIP: 69263

(v) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC compatible  
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: FR PH95033  
(B) FILING DATE: 02-JUN-1995  
(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:

(A) NAME: Chretien, Francois

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:

(A) TELEPHONE: 72-29-26-42  
(B) TELEFAX: 72-29-28-43

### (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1077 base pairs  
(B) TYPE: nucleic acid  
(C) STRANDEDNESS: double  
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Pseudomonas fluorescens*

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

ATGGCAGATC TATACGAAAA CCCAATGGGC CTGATGGGCT TTGAATTCAT CGAATTAGCG	60
TGCTTCAGCG TGGGTACCGT GGAGCCGATC TTCGAGATCA TGGGCTTCAC CAAAGTCGCG	120
ACCCACCGTT CCAAGAACGT GCACCTGTAC CGCCAGGGCG AGATCAACCT GATCCTCAAC	180
AACGAGCCCA ACAGCATCGC CTCCTACTTT GCGGCCGAAC ACGGCCCGTC GGTGTGCGGC	240
ATGGCGTTCC GCGTGAAGGA CTCGCAAAG GCCTACAACC GCGCCCTGGA ACTCGGCGCC	300
CAGCCGATCC ATATTGACAC CGGGCCGATG GAATTGAACC TGCCGGCGAT CAAGGGCATC	360
GGCGGCGCGC CGTTGTACCT GATCGACCGT TTCGGCGAAG GCAGCTCGAT CTACGACATC	420
GACTTCGTGT ACCTCGAAGG TGTGGAGCGC AATCCGGTCG GTGCAGGTCT CAAAGTCATC	480
GACCACCTGA CCCACAACGT CTATCGCGGC CGCATGGTCT ACTGGGCCAA CTTCTACGAG	540
AAATTGTTCA ACTTCCGTGA AGCGCGTTAC TTCGATATCA AGGGCGAGTA CACCGGCCTG	600
ACTTCCAAGG CCATGAGTGC GCCGGACGGC ATGATCCGCA TCCCGCTGAA CGAAGAGTCG	660
TCCAAGGGCG CGGGGCAGAT CGAAGAGTTC CTGATGCAGT TCAACGGCGA AGGCATCCAG	720
CACGTGGCGT TCCTCACCGA CGACCTGGTC AAGACCTGGG ACGCGTTGAA GAAAATCGGC	780
ATGCGCTTCA TGACCGCGCC GCCAGACACT TATTACGAAA TGCTCGAAGG CCGCCTGCCT	840
GACCACGGCG AGCCGGTGGA TCAACTGCAG GCACGCGGTA TCCTGCTGGA CGGATCTTCC	900
GTGGAAGGCG ACAAACGCCT GCTGCTGCAG ATCTTCTCGG AAACCCTGAT GGGCCCGGTG	960
TTCTTCGAAT TCATCCAGCG CAAGGGCGAC GATGGGTTTG GCGAGGGCAA CTTCAAGGCG	1020
CTGTTCCAGT CCATCGAACG TGACCAGGTG CGTCGTGGTG TATTGACCGC CGATTAA	1077

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1338 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Arabidopsis thaliana
- (B) STRAIN: Columbia
- (D) DEVELOPMENTAL STAGE: Young green plant

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (A) LIBRARY: Uni zap XR STRATAGENE

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

ATGGGCCACC AAAACGCCGC CGTTTCAGAG AATCAAAACC ATGATGACGG CGCTGCGTCG	60
TCGCCGGGAT TCAAGCTCGT CGGATTTTCC AAGTTCGTAA GAAAGAATCC AAAGTCTGAT	120

AAATTCAAGG TTAAGCGCTT CCATCACATC GAGTTCTGGT GCGGCGACGC AACCAACGTC	180
GCTCGTGGCT TCTCGTGGG TCTGGGGATG AGATTCTCCG CCAAATCCGA TCTTTCCACC	240
GGAAACATGG TTCACGGCTC TTACCTACTC ACCTCCGGTG ACCTCCGATT CCTTTTCACT	300
GCTCGTTACT CTGGTCTCT CTCCGCCGGA GAGATTAAAC CGACAACCAC AGCTTCTATC	360
CCAAAGTTTCG ATCACGGCTC TTGTCGTTCC TTCTTCTCTT CACATGGTCT CGGTGTTAGA	420
GCCGTTGCCA TTGAAGTAGA AGACGCAGAG TCAGCTTTCT CCATCAGTGT AGCTAATGGC	480
GCTATTCCTT CGTCGCCTCC TATCGTCCTC AATGAAGCAG TTACGATCGC TGAGGTTAAA	540
CTATACGGCG ATGTTGTCTT CCGATATGTT AGTTACAAAG CAGAAGATAC CGAAAAATCC	600
GAATTCTTGC CAGGGTTCGA GCGGTAGAG GATGCGTCGT CGTTCCCAT TGGATTATGGT	660
ATCCGGCGGC TTGACCACGC CGTGGGAAAC GTTCCTGAGC TTGGTCCGGC TTTAACTTAT	720
GTAGCGGGGT TCACTGGTTT TCACCAATTC GCAGAGTTCA CAGCAGACGA CGTTGGAACC	780
GCCGAGAGCG GTTTAAATTC AGCGGTCCTG GCTAGCAATG ATGAAATGGT TCTTCTACCG	840
ATTAACGAGC CAGTGACGG AACAAAGAGG AAGAGTCAGA TTCAGACGTA TTTGGAACAT	900
AACGAAGCG CAGGGCTACA ACATCTGGCT CTGATGAGTG AAGACATATT CAGGACCCTG	960
AGAGAGATGA GGAAGAGGAG CAGTATTGGA GGATTCGACT TCATGCCTTC TCCTCCGCCT	1020
ACTTACTACC AGAATCTCAA GAAACGGGTC GCGGACGTGC TCAGCGATGA TCAGATCAAG	1080
GAGTGTGAGG AATTAGGGAT TCTTGTAGAC AGAGATGATC AAGGGACGTT GCTTCAAATC	1140
TTCAAAAAC CACTAGGTGA CAGGCCGACG ATATTTATAG AGATAATCCA GAGAGTAGGA	1200
TGCATGATGA AAGATGAGGA AGGGAAGGCT TACCAGAGTG GAGGATGTGG TGGTTTTGGC	1260
AAAGGCAATT TCTCTGAGCT CTTCAAGTCC ATTGAAGAAT ACGAAAAGAC TCTTGAAGCC	1320
AACAGTTAG TGGGATGA	1338

## (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 1329 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

## (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

## (iii) HYPOTHETICAL: NO

## (iv) ANTI-SENSE: NO

## (vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: *Daucus carota*
- (D) DEVELOPMENTAL STAGE: Suspension cells

## (vii) IMMEDIATE SOURCE:

- (A) LIBRARY: Uni zap XR STRATAGENE

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

ATGGGGAAAA AACAAATCGGA AGCTGAAATT CTCTCAAGCA ATTCATCAAA CACCTCTCCT	60
--	----

GCAACATTCA AGCTGGTGGG TTTCAACAAC TTCGTCCGCG CCAACCCCAA GTCCGATCAC	120
TTCCGCCGTGA AGCGGTTCCA CCACATTGAG TTCTGGTGGG GCGACGCCAC CAACACGTGG	180
CGGCGGTTCCT CGTGGGGCCT CGGCATGCCT TTGGTGGCGA AATCGGATCT CTCTACTGGA	240
AACTCTGTTC ACGCTTCTTA TCTTGTTGCG TCGGCGAATC TCAGTTTCGT CTTACCCGCT	300
CCTTACTCTC CGTCCACGAC CACTTCCTCT GGTTCAGCTG CCATCCCGTC TTTTTCGGCA	360
TCGGGTTTTT ACTCTTTTGC GGCCAAACAC GGCCTTGCTG TTCGGGCTAT TGCTCTTGAA	420
GTTGCTGACG TGGCTGCTGC GTTTGAGGCC AGTGTTCGCG GTGGGGCCAG GCCGGCTTCG	480
GCTCCTGTG AATTGGACGA CCAGGCGTGG TTGGCTGAGG TGGAGTTGTA CGGAGATGTG	540
GTCTTGAGGT TTGTTAGTTT TGGGAGGGAG GAGGGTTTGT TTTGCCTGG ATTCGAGGCG	600
GTGGAGGGGA CGGCGTCGTT TCCGGATTTG GATTATGGAA TTAGAAGACT TGATCATGCG	660
GTGGGGAATG TTACCGAGTT GGGGCCTGTG GTGGAGTATA TTAAAGGTT TACGGGGTTT	720
CATGAATTTG CGGAGTTTAC AGCGGAGGAT GTGGGGACTT TGGAGAGTGG GTTGAATTCG	780
GTGGTGTGG CGAATAATGA GGAGATGGTT CTGTTGCCCT TGAATGAGCC TGTGTATGGG	840
ACCAAGAGGA AGAGTCAGAT ACAGACTTAC TTGGAGCACA ATGAAGGGGC TGGAGTGCAG	900
CATTTGGCTT TAGTGAGTGA GGATATTTT AGGACTTTAA GGGAGATGAG GAAGAGGAGT	960
TGCCTTGGTG GTTTTGAGTT TATGCCTTCG CCACCGCCTA CGTATTACAA GAATTTGAAG	1020
AATAGGGTCG GGGATGTGTT GAGTGATGAA CAGATCAAGG AGTGTGAAGA TTTGGGGATT	1080
TTGGTGGATA GGGATGATCA GGGTACATTG CTTCAAATCT TTACCAAGCC TGTAGGTGAC	1140
AGGCCTACCT TATTCATAGA GATCATTAG AGGGTAGGGT GCATGCTCAA GGACGATGCA	1200
GGGCAGATGT ACCAGAAGGG CGGGTCCGGA GGATTTGGGA AGGGGAAGTT CTCAGAGCTG	1260
TTCAAGTCCA TCGAAGAATA TGAAAAACA CTTGAAGCTA AACAAATCAC TGGATCTGCT	1320
GCTGCATGA	1329

## Revendications

5

1. Séquence d'un gène d'origine non humaine ou d'une bactérie non marine, isolée ou séquence, pouvant s'hybrider avec cette séquence, caractérisé en ce qu'elle exprime une hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD).

10

2. Séquence selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'elle est d'origine bactérienne ou de plante.

3. Séquence selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'elle est issue de *Pseudomonas* sp.

15

4. Séquence selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est issue de *Pseudomonas fluorescens*.

5. Séquence selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'elle est d'origine végétale.

20

6. Séquence selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'elle est issue d'*Arabidopsis*.

7. Séquence selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'elle est issue d'une ombellifère.

25

8. Procédé d'isolement du gène selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que:

- on choisit, comme amorces, quelques oligonucléotides issus de la séquence en acides aminés d'une HPPD.

- à partir de ces amorces, on synthétise des fragments d'amplification par PCR

- on isole le gène par création et le criblage d'une banque génomique et

30

- on clone le gène.

9. Gène chimère pour la transformation génétique des plantes comprenant, dans le sens de la transcription:

- au moins une séquence de régulation promotrice issue d'un gène s'exprimant

35

- naturellement dans les plantes,

- une séquence codante hétérologue,

- au moins une séquence de polyadénylation,

caractérisé en ce que la séquence codante est une séquence d'un gène qui exprime l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase (HPPD).

- 5 10. Gène chimère selon la revendication 9, caractérisée en ce que la séquence de régulation promotrice favorise la surexpression de la séquence codante.
11. Gène chimère selon la revendication 10, caractérisé en ce que la séquence de régulation promotrice comprend au moins un promoteur d'histone.
- 10 12. Gène chimère selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend, entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante, un peptide de transit.
- 15 13. Gène chimère selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend, entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante, un peptide de transit optimisé comprenant, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale.
- 20 14. Gène chimère selon l'une des revendications 9 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend, entre la séquence de régulation promotrice et la séquence codante, une séquence d'un activateur de transcription (enhancer).
- 25 15. Vecteur utilisable pour la transformation génétique des plantes, caractérisé en ce qu'il comprend un gène chimère selon l'une des revendications 9 à 14.
16. Cellule végétale, caractérisée en ce qu'elle comprend un gène chimère selon l'une des revendications 9 à 14.
- 30 17. Plante, caractérisée en ce qu'elle est régénérée à partir de cellules selon la revendication 16.
18. Plante, selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle appartient à la famille des
- 35 dicotylédones.

19. Procédé de transformation de plantes pour les rendre tolérantes aux inhibiteurs de l'HPPD, caractérisé en ce qu'on introduit dans la cellule végétale un gène exprimant un HPPD exogène.
- 5 20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le transfert est effectué avec *Agrobacterium tumefaciens* ou *Agrobacterium rhizogenes*.
21. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le transfert est effectué par apport par bombardement à l'aide de particules chargées de l'ADN.
- 10 22. Procédé de transformation de plantes, caractérisé en ce qu'on introduit dans la cellule végétale un gène exprimant un HPPD exogène comme marqueur de sélection.
23. Procédé de traitement herbicide sélectif de plantes, caractérisé en ce qu'on applique un inhibiteur du gène l'HPPD à une plante selon l'une des revendications 17 et 18.
- 15 24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène de l'HPPD est un isoxazole.
- 20 25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que l'isoxazole est le 4-[4-CF<sub>3</sub>-2-(méthylsulfoyl)benzoyl]-5-cyclopropyl isoxazole.
26. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène de l'HPPD est un dicétonitrile.
- 25 27. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène l'HPPD est une tricétone.
28. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'inhibiteur du gène l'HPPD est la sulcotrione.
- 30

GCNGAYTTNTAYGARAAYCCNATGG GNYTNATGGGNTTYGARTTYATHGA RYTNGCNWSNCCNACNCCNAAAYACH	75
A D L Y E N P M G L M G F E F I E L A S P T P N T	
YTNGARCCNATHHTTYGARATHATGG GNTTYACNAARGTNGCNACNAYMG MWSNAARGAYGTNCAYTTNTAYMGN	150
L E P I F E I M G F T K V A T H R S K D V H L Y R	
CARGGNGCNATHAAYTTNATHYTNA AYAAYGARCCNAYWSNGTNGCNWS NTAYTTYGCNGCNGARCAAYGGNCCN	225
Q G A I N L I L N N E P H S V A S Y F A A E H G P	
WSNGTNGYGGNATGGCNTTYMGNG TNAARGAYWSNCARAARGCNTAYAA RMGNGCNYTNGARYTNGGNGCNCAR	300
S V C G M A F R V K D S Q K A Y K R A L E L G A Q	
CCNATHCAYATHGARACNGGNCNA TGGARYTNAAYTTNCCNGCNATHAA RGGNATHGGNGGNGCNCNYTNTAY	375
P I H I E T G P M E L N L P A I K G I G G A P L Y	
YTNAHGAYMGNTTYGGNGARGGNW SNWSNATHAYGAYATHGAYTTYGT NTYYTNGARGGNGTNGAYMGNCAY	450
K I D R F G E G S S I Y D I D F V F L E G V D R H	
CCNGTNGGNGCNGGNYTNAARATHA THGAYCAYTNACNCAAYAAYGTNTA YMGNGGNGNATGGCNTAYTGGGCH	525
P V G A G L K I I D H L T H N V Y R G R M A Y W A	
AAYTTYTAYGARAARYTNTTYAAYT TYMGNGARATHMGNTAYTTYGAYAT HAARGGNGARTAYACNGGNYTNACN	600
N F Y E K L F N F R E I R Y F D I K G E Y T G L T	
WSNAARGCNATGACNGCNCNGAYG GNATGATHMGNATHCCNYTNAAYGA RGARWSMWSNAARGGNGCNGGNCAR	675
S K A M T A P D G M I R I P L N E E S S K G A G Q	
ATHGARGARTTYTNTATGCARTTYA AYGGNGARGGNATHCARCAYGTNGC NTYYTMSNGAYGAYTNAATHAAR	750
I E E F L M Q F N G E G I Q H V A F L S D D L I K	
ACNTGGGAYCAYTNAARWSNATHG GNATMGNTTYATGACNGCNCNCC NGAYACNTAYTAYGARATGYTNGAR	825
T W D H L K S I G M R F M T A P P D T Y Y E M L E	
GGNMGNYTNCNAAAYCAYGGNGARC CNGTNGGNGARYTNCARGCNMGNGG NATHYTNYTNGAYGGNWSMWSNGAR	900
G R L P N H G E P V G E L Q A R G I L L D G S S E	
WSNGGNGAYAARMGNYTNYTNYTNC ARATHTTYWSNGARACNYTNATGGG NCCNGTNTTYTTYGARTTYATHCAR	975
S G D K R L L L Q I F S E T L M G P V F F E F I Q	
MGNAARGGNGAYGAYGGNTTYGGNG ARGGNAAYTTYAARGCNYTNTTYGA RWSNATHGARMGNGAYCARGTNMGN	1050
R K G D D G F G E G N F K A L F E S I E R D Q V R	
MGNGGNGTNYTNWSNACNGAY	1071
R G V L S T D	

Fig 1



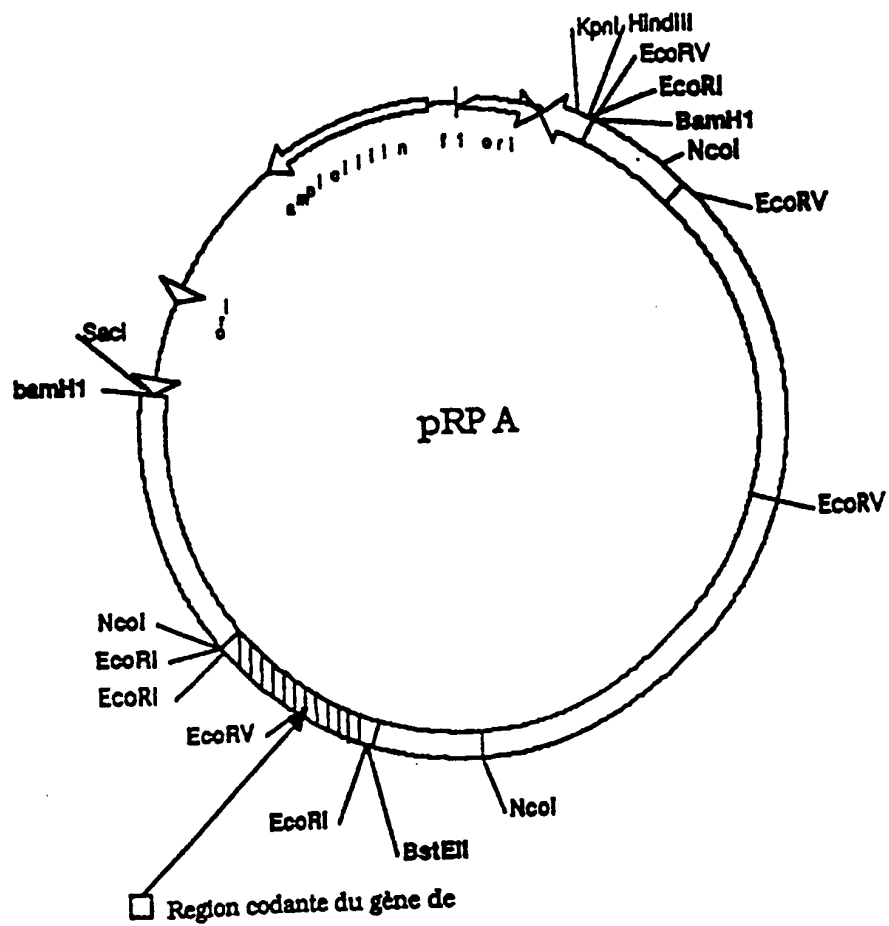


Fig 2.

Consensus	.ADLYENPMG	LMGFEFIE.A	SPTP.TLEPI	FEIMGFTKVA	THRSK.VHLY	50
P. fluorescens	M.....	.....F.	....G.....	.....	.....N....	50
Pseudomonas sp.	-.....	.....L.	....N.....	.....	.....D....	49
Consensus	RQG.INLILN	NEP.S.ASYF	AAEHGPSVCG	MAFRVKDSQK	AY.RALELGA	100
P. fluorescens	...E.....	...N.I....	.....	.....	..N.....	100
Pseudomonas sp.	...A.....	...H.V....	.....	.....	..K.....	99
Consensus	QPIHI.TGPM	ELNLPAIKGI	GGAPLYLIDR	FGEGSSIYDI	DFV.LEGV.R	150
P. fluorescens	.....D....	.....	.....	.....	...Y....E.	150
Pseudomonas sp.	.....E....	.....	.....	.....	...F....D.	149
Consensus	.PVGAGLK.I	DHLTHNVYRG	RM.YWANFYE	KLFNFRE.RY	FDIKGEYTG	200
P. fluorescens	N.....V.	.....	..V.....	.....A..	.....	200
Pseudomonas sp.	H.....I.	.....	..A.....	.....I..	.....	199
Consensus	TSKAM.APDG	MIRIPLNEES	SKGAGQIEEF	LMQFNAGEIQ	HVAFL.DDL.	250
P. fluorescens	.....S....	.....	.....	.....	.....T...V	250
Pseudomonas sp.	.....T....	.....	.....	.....	.....S...I	249
Consensus	KTWD.LK.IG	MRFTAPPDT	YYENLEGRLP	.HGEPV..LQ	ARGILLDGSS	300
P. fluorescens	....A..K..	.....	.....	D....DQ..	.....	300
Pseudomonas sp.	....H..S..	.....	.....	N....GE..	.....	299
Consensus	..GDKRLLQ	IFSETLMGPV	FFEFIQRKGD	DGFGEGNFKA	LFESIERDQV	350
P. fluorescens	VE.....	.....	.....	.....	.....	350
Pseudomonas sp.	ES.....	.....	.....	.....	.....	349
Consensus	RRGVL..D					358
P. fluorescens	.....TA.					358
Pseudomonas sp.	.....ST.					357

Fig. 3

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/53, 15/82, 5/10, A01H 5/00</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 96/38567</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 5 décembre 1996 (05.12.96)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR96/00831 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 3 juin 1996 (03.06.96)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 95/06800 2 juin 1995 (02.06.95) FR 95/13570 10 novembre 1995 (10.11.95) FR 96/05944 17 mai 1996 (17.05.96) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> RHONE-POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14-20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> SAILLAND, Alain [FR/FR]; 38, rue Ernest-Fabrigue, F-69009 Lyon (FR). ROLLAND, Anne [FR/FR]; 41, rue Louis-Bouquet, F-69009 Lyon (FR). MATRINGE, Michel [FR/FR]; 5, chemin de Montpellas, F-69009 Lyon (FR). PALLETT, Ken [GB/GB]; Ongar, Essex CM5 0HW (GB).  <b>(74) Mandataire:</b> CHRETIEN, François; Rhône-Poulenc Agrochimie, 14-20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>  <b>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:</b> 22 mai 1997 (22.05.97)
<b>(54) Title:</b> DNA SEQUENCE OF A GENE OF HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE AND PRODUCTION OF PLANTS CONTAINING A GENE OF HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE AND WHICH ARE TOLERANT TO CERTAIN HERBICIDES  <b>(54) Titre:</b> SEQUENCE ADN D'UN GENE DE L'HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE ET OBTENTION DE PLANTES CONTENANT UN GENE DE L'HYDROXY-PHENYL PYRUVATE DIOXYGENASE, TOLERANTES A CERTAINS HERBICIDES  <b>(57) Abstract</b> <p>DNA sequence of a gene of hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase and production of plants containing a gene of hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase and which are resistant to herbicides. DNA sequence of a gene of hydroxy-phenyl pyruvate dioxygenase; isolation from a bacteria or a plant; utilization for obtaining plants tolerant to herbicides.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Séquence ADN d'un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase et obtention de plantes contenant un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase, résistantes aux herbicides. Séquence ADN d'un gène de l'hydroxy-phényl pyruvate dioxygénase; isolement à partir d'une bactérie ou d'une plante; utilisation pour l'obtention de plantes tolérantes aux herbicides.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inv. No. Application No  
PCT/FR 96/00831

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/53 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF BACTERIOLOGY 176 (17). 1994. 5312-5319., XP002028042 DENOYA C. D., ET AL.: "A Streptomyces avermilis gene encoding a 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxxygenase-like protein that directs the production of homogentisic acid and an ochronotic pigment in Escherichia coli." see the whole document	1,2
Y	---	3,4,8
Y	EUR J BIOCHEM 205 (2). 1992. 459-466, XP002028045 RUETSCHI U., ET AL.: "CHARACTERIZATION OF 4 HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE PRIMARY STRUCTURE OF THE PSEUDOMONAS ENZYME." see the whole document	3,4,8
	---	
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 1997

Date of mailing of the international search report

22.04.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.  
PCT/FR 96/00831

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Relevant to claim No.
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
X	INFECT. IMMUN. (1994), 62(3), 1109-17, XP002028047 WINTERMEYER, EVA ET AL: "Sequence determination and mutational analysis of the lly locus of Legionella pneumophila" see the whole document ---	1,2
X	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 267, no. 34, 5 December 1992, pages 24235-24240, XP002028043 ENDO, F., ET AL.: "Primary structure deduced from complementary DNA sequence and expression in cultured cells of mammalian 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase" see the whole document ---	1
Y	---	5,7,8
Y	PHOTOSYNTHESIS: FROM LIGHT TO BIOSPHERE. VOLUME V. PROCEEDINGS OF THE XTH INTERNATIONAL PHOTOSYNTHESIS CONGRESS, MONTPELLIER, FRANCE, 20-25 AUGUST, 1995, (1995) PP. 285-288. 7 REF. PUBLISHER: KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS. DORDRECHT, XP000646348 LENNE, C. ET AL: "Localization and partial purification of p- hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells" see the whole document ---	5,7
Y	MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL SECOND EDITION., pages 14.7-14.8, XP002028046 SAMBROOK, J., ET AL.: "Generation of probes specific for uncloned genes by selective amplification of particular segments of cDNA" see the whole document ---	8
X	EP 0 652 286 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 10 May 1995 see page 7, line 35 - line 47 ---	9-28
X	EMBL SEQUENCE DATABASE, REL. 40, 16-JUN-1994, ACCESSION NO. T20952, XP002028637 NEWMAN, T., ET AL.: "2960 Arabidopsis thaliana cDNA clone 91B13T7" see the sequence --- -/--	1,2,6

2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/00831

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	EMBL SEQUENCE DATABASE, REL. 47, 8-MAR-1996, ACCESSION NO. N65764, XP002029449 NEWMAN, T., ET AL.: "20804 Araabidopsis thaliana cDNA clone 231K20T7" see the sequence ---	1,2,6
P,X	GENE (AMSTERDAM) 161 (1). 1995. 107-111., XP002028636 WYCKOFF E E ET AL: "Cloning and expression of a gene encoding a T-cell reactive protein from Coccidioides immitis: Homology to 4--hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and the mammalian F antigen." see the whole document ---	1,2
A	GENOMICS, vol. 23, no. 3, 1 October 1994, pages 534-539, XP000561826 HISATAKA AWATA ET AL: "STRUCTURE OF THE HUMAN 4-HYDROXYPHENYLPYRUVIC ACID DIOXYGENASE GENE (HPD)" see the whole document ---	1
A	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 124 (2). 1994. 179-184., XP002028048 RUZAFI C., ET AL.: "The protein encoded by the Shewanella colwelliana mela gene is a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase" see the whole document ---	2
A	GENE, vol. 109, pages 131-136, XP002028044 FUQUA, W.C., ET AL.: "Characterization of mela: a gene encoding melanin biosynthesis from the marine bacterium Shewanella colwelliana" see the whole document ---	3,4,8
A	FEBS LETTERS, vol. 318, no. 2, AMSTERDAM NL, pages 162-166, XP002028049 SCHULZ, A., ET AL.: "SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase" see the whole document ---	9-28
A	EP 0 507 698 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 7 October 1992 see the whole document ---	11
	---	

2  
4

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 96/00831

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 508 909 A (RHONE-POULENC AGROCHIMIE) 14 October 1992 see the whole document ---	13
A	EP 0 614 970 A (HOECHST SCHERING AGREVO GMBH) 14 September 1994 see the whole document ---	5-7
A	41ST HUNGARIAN PLANT PROTECTION DAYS, BUDAPEST, HUNGARY, FEBRUARY 21-22, 1995. PESTICIDE SCIENCE 45 (3). 1995. 286-287., XP000547268 BARTA I C ET AL: "Benzoylcyclohexanedione herbicides are strong inhibitors of purified p- hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase of maize." see the whole document ---	5-7, 9-28
A	PLANT PHYSIOLOGY, (1994) VOL. 106, NO. 4, PP. 1429-1433., XP002028050 SECOR, J.: "Inhibition of barnyardgrass 4- hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by sulcotrione" see the whole document ---	9-28
A	THE PLANT JOURNAL, vol. 6, no. 4, 1994, pages 481-489, XP002017203 MISAWA, N., ET AL.: "Expression of an Erwinia phytoene desaturase gene not only confers multiple resistance to herbicides interfering with carotenoid biosynthesis but also alters xanthophyll metabolism in transgenic plants" see the whole document -----	9-28



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No

PCT/FR 96/00831

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0652286 A	10-05-95	FR 2712302 A	19-05-95
		AU 7775194 A	18-05-95
		BG 99169 A	28-07-95
		BR 9404562 A	20-06-95
		CA 2135461 A	11-05-95
		CN 1121958 A	08-05-96
		CZ 9402743 A	13-09-95
		HU 70464 A	30-10-95
		JP 7184664 A	25-07-95
		NZ 264879 A	28-10-96
		PL 305775 A	15-05-95
		SK 134094 A	07-06-95
		ZA 9408826 A	17-07-95
EP 0507698 A	07-10-92	FR 2673642 A	11-09-92
		AU 652417 B	25-08-94
		AU 1144392 A	10-09-92
		CA 2061835 A	06-09-92
		JP 5076369 A	30-03-93
		US 5491288 A	13-02-96
EP 0508909 A	14-10-92	FR 2673643 A	11-09-92
		AU 652610 B	01-09-94
		AU 1144292 A	10-09-92
		CA 2061636 A	06-09-92
		IL 101115 A	10-01-97
		JP 5095789 A	20-04-93
		US 5510471 A	23-04-96
EP 0614970 A	14-09-94	DE 4305696 A	01-09-94
		CA 2116421 A	26-08-94
		JP 6343464 A	20-12-94

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e Internationale No  
PCT/FR 96/00831

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/53 C12N15/82 C12N5/10 A01H5/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou a la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultee (systeme de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12N A01H

Documentation consultee autre que la documentation minimale dans la mesure ou ces documents relevent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de donnees electronique consultee au cours de la recherche internationale (nom de la base de donnees, et si cela est realisable, termes de recherche utilises)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie *	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
X	JOURNAL OF BACTERIOLOGY 176 (17). 1994. 5312-5319., XP002028042 DENOYA C. D., ET AL.: "A Streptomyces avermitilis gene encoding a 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase-like protein that directs the production of homogentisic acid and an ochronotic pigment in Escherichia coli." voir le document en entier	1,2
Y	---	3,4,8
Y	EUR J BIOCHEM 205 (2). 1992. 459-466, XP002028045 RUETSCHI U., ET AL.: "CHARACTERIZATION OF 4 HYDROXYPHENYLPYRUVATE DIOXYGENASE PRIMARY STRUCTURE OF THE PSEUDOMONAS ENZYME." voir le document en entier	3,4,8
	---	
	---	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiques en annexe

### \* Categories speciales de documents cites:

- \*A\* document definissant l'etat general de la technique, non considere comme particulierement pertinent
- \*E\* document anterieur, mais publie a la date de depot international ou apres cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorite ou cite pour determiner la date de publication d'une autre citation ou pour une raison speciale (telle qu'indiquee)
- \*O\* document se referant a une divulgation orale, a un usage, a une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publie avant la date de depot international, mais posterieurement a la date de priorite revendiquee

- \*T\* document ulterieur publie apres la date de depot international ou la date de priorite et n'appartenant pas a l'etat de la technique pertinent, mais cite pour comprendre le principe ou la theorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulierement pertinent, l'invention revendiquee ne peut etre consideree comme nouvelle ou comme impliquant une activite inventive par rapport au document considere isolement
- \*Y\* document particulierement pertinent, l'invention revendiquee ne peut etre consideree comme impliquant une activite inventive lorsque le document est associe a un ou plusieurs autres documents de meme nature, cette combinaison etant evidente pour une personne du metier
- \*Z\* document qui fait partie de la meme famille de brevets

2

Date a laquelle la recherche internationale a ete effectivement achevee

15 Avril 1997

Date d'expedition du present rapport de recherche internationale

22.04.97

Nom et adresse postale de l'administration chargee de la recherche internationale  
Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorise

Maddox, A

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der 'e Internationale No  
PCT/FR 96/00831

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		no. des revendications visées
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
X	INFECT. IMMUN. (1994), 62(3), 1109-17. XP002028047 WINTERMEYER, EVA ET AL: "Sequence determination and mutational analysis of the lly locus of Legionella pneumophila" voir le document en entier ---	1,2
X	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 267, no. 34, 5 Décembre 1992, pages 24235-24240, XP002028043 ENDO, F., ET AL.: "Primary structure deduced from complementary DNA sequence and expression in cultured cells of mammalian 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase" voir le document en entier ---	1
Y	PHOTOSYNTHESIS: FROM LIGHT TO BIOSPHERE. VOLUME V. PROCEEDINGS OF THE XTH INTERNATIONAL PHOTOSYNTHESIS CONGRESS, MONTPELLIER, FRANCE, 20-25 AUGUST, 1995, (1995) PP. 285-288. 7 REF. PUBLISHER: KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS. DORDRECHT, XP000646348 LENNE, C. ET AL: "Localization and partial purification of p- hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from cultured carrot cells" voir le document en entier ---	5,7,8 5,7
Y	MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL SECOND EDITION., pages 14.7-14.8, XP002028046 SAMBROOK, J., ET AL.: "Generation of probes specific for uncloned genes by selective amplification of particular segments of cDNA" voir le document en entier ---	8
X	EP 0 652 286 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 10 Mai 1995 voir page 7, ligne 35 - ligne 47 ---	9-28
X	EMBL SEQUENCE DATABASE, REL. 40, 16-JUN-1994, ACCESSION NO. T20952, XP002028637 NEWMAN, T., ET AL.: "2960 Arabidopsis thaliana cDNA clone 91B13T7" voir la séquence --- -/--	1,2,6

2

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No  
PCT/FR 96/00831

C. (suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		no. des revendications visées
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
P,X	EMBL SEQUENCE DATABASE, REL. 47, 8-MAR-1996, ACCESSION NO. N65764, XP002029449 NEWMAN, T., ET AL.: "20804 Araabidopsis thaliana cDNA clone 231K20T7" voir la séquence ---	1,2,6
P,X	GENE (AMSTERDAM) 161 (1). 1995. 107-111., XP002028636 WYCKOFF E E ET AL: "Cloning and expression of a gene encoding a T-cell reactive protein from Coccidioides immitis: Homology to 4--hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and the mammalian F antigen." voir le document en entier ---	1,2
A	GENOMICS, vol. 23, no. 3, 1 Octobre 1994, pages 534-539, XP000561826 HISATAKA AWATA ET AL: "STRUCTURE OF THE HUMAN 4-HYDROXYPHENYLPYRUVIC ACID DIOXYGENASE GENE (HPD)" voir le document en entier ---	1
A	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 124 (2). 1994. 179-184., XP002028048 RUZAFI C., ET AL.: "The protein encoded by the Shewanella colwelliana mela gene is a p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase" voir le document en entier ---	2
A	GENE, vol. 109, pages 131-136, XP002028044 FUQUA, W.C., ET AL.: "Characterization of mela: a gene encoding melanin biosynthesis from the marine bacterium Shewanella colwelliana" voir le document en entier ---	3,4,8
A	FEBS LETTERS, vol. 318, no. 2, AMSTERDAM NL, pages 162-166, XP002028049 SCHULZ, A., ET AL.: "SC-0051, a 2-benzoyl-cyclohexane-1,3-dione bleaching herbicide, is a potent inhibitor of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase" voir le document en entier ---	9-28
2 4 A	EP 0 507 698 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 7 Octobre 1992 voir le document en entier ---	11
	--- -/--	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dev : Internationale No  
PCT/FR 96/00831

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		no. des revendications visées
Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
A	EP 0 508 909 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 14 Octobre 1992 voir le document en entier ---	13
A	EP 0 614 970 A (HOECHST SCHERING AGREVO GMBH) 14 Septembre 1994 voir le document en entier ---	5-7
A	41ST HUNGARIAN PLANT PROTECTION DAYS, BUDAPEST, HUNGARY, FEBRUARY 21-22, 1995. PESTICIDE SCIENCE 45 (3). 1995. 286-287., XP000547268 BARTA I C ET AL: "Benzoylcyclohexanedione herbicides are strong inhibitors of purified p- hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase of maize." voir le document en entier ---	5-7,9-28
A	PLANT PHYSIOLOGY, (1994) VOL. 106, NO. 4, PP. 1429-1433., XP002028050 SECOR, J.: "Inhibition of barnyardgrass 4- hydroxyphenylpyruvate dioxygenase by sulcotrione" voir le document en entier ---	9-28
A	THE PLANT JOURNAL, vol. 6, no. 4, 1994, pages 481-489, XP002017203 MISAWA, N., ET AL.: "Expression of an Erwinia phytoene desaturase gene not only confers multiple resistance to herbicides interfering with carotenoid biosynthesis but also alters xanthophyll metabolism in transgenic plants" voir le document en entier -----	9-28

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De le internationale No  
PCT/FR 96/00831

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets(s)	Date de publication
EP 0652286 A	10-05-95	FR 2712302 A	19-05-95
		AU 7775194 A	18-05-95
		BG 99169 A	28-07-95
		BR 9404562 A	20-06-95
		CA 2135461 A	11-05-95
		CN 1121958 A	08-05-96
		CZ 9402743 A	13-09-95
		HU 70464 A	30-10-95
		JP 7184664 A	25-07-95
		NZ 264879 A	28-10-96
		PL 305775 A	15-05-95
		SK 134094 A	07-06-95
		ZA 9408826 A	17-07-95
EP 0507698 A	07-10-92	FR 2673642 A	11-09-92
		AU 652417 B	25-08-94
		AU 1144392 A	10-09-92
		CA 2061835 A	06-09-92
		JP 5076369 A	30-03-93
		US 5491288 A	13-02-96
EP 0508909 A	14-10-92	FR 2673643 A	11-09-92
		AU 652610 B	01-09-94
		AU 1144292 A	10-09-92
		CA 2061636 A	06-09-92
		IL 101115 A	10-01-97
		JP 5095789 A	20-04-93
		US 5510471 A	23-04-96
EP 0614970 A	14-09-94	DE 4305696 A	01-09-94
		CA 2116421 A	26-08-94
		JP 6343464 A	20-12-94



# **RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 596519  
FR 0010601

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	WO 99 24585 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 20 mai 1999 (1999-05-20) * page 8, ligne 6 - ligne 11 * * page 13, ligne 1 - ligne 3 * ---	1-13	C12N15/63 A01H1/04
A	WO 96 38567 A (MATRINGE MICHEL ;ROLLAND ANNE (FR); SAILLAND ALAIN (FR); RHONE POU) 5 décembre 1996 (1996-12-05) * page 2, ligne 14 - ligne 18 * * page 4, ligne 3 - ligne 5 * ---	1-13	
A	US 5 217 902 A (JONES JONATHAN ET AL) 8 juin 1993 (1993-06-08) * le document en entier * -----	1-13	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			C12N A01H
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
8 mai 2001		Maddox, A	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un  autre document de la même catégorie  A : arrière-plan technologique  O : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure  à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date  de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0010601 FA 596519**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.  
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date 08-05-2001  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9924585     A	20-05-1999	FR 2770854 A	14-05-1999
		AU 1160399 A	31-05-1999
		AU 1161499 A	31-05-1999
		CN 1285875 T	28-02-2001
		EP 1029059 A	23-08-2000
		EP 1029060 A	23-08-2000
		WO 9924586 A	20-05-1999
		ZA 9810076 A	07-05-1999
WO 9638567     A	05-12-1996	FR 2734840 A	06-12-1996
		FR 2734841 A	06-12-1996
		FR 2734842 A	06-12-1996
		AU 718982 B	04-05-2000
		AU 6228696 A	18-12-1996
		BG 102131 A	31-07-1998
		BR 9608375 A	05-01-1999
		CA 2219979 A	05-12-1996
		CN 1192243 A	02-09-1998
		CZ 9703809 A	18-03-1998
		EP 0828837 A	18-03-1998
		HR 960245 A	31-08-1997
		HU 9900450 A	28-05-1999
		JP 11505729 T	25-05-1999
		PL 323679 A	14-04-1998
		SK 161597 A	08-07-1998
		TR 9701492 T	21-02-1998
US 5217902     A	08-06-1993	US 5073675 A	17-12-1991

EPO FORM P0485